

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号： 15401  
研究種目： 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）  
研究期間： 2017～2022  
課題番号： 17KK0161  
研究課題名（和文） 幼若期ストレスによって変容する薬物依存性と共感性行動の脳内分子メカニズム解析

研究課題名（英文） Analysis of Brain Molecular Mechanisms of Drug Addiction and Empathic Behavior Altered by Juvenile Stress

研究代表者  
吉田 隆行（Yoshida, Takayuki）  
広島大学・医系科学研究科（医）・准教授

研究者番号： 60374229  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,700,000円  
渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：共感様行動である観察恐怖学習に関わる分子・神経回路・行動機能について、内側前頭前皮質背側部(dmPFC)からの神経投射は扁桃体基底部(BA)、中脳水道周囲灰白質(PAG)、前障(CLA)、無顆粒島皮質(AI)に多く、dmPFCに出力するニューロンはBA、CLA、AIおよび腹側海馬(vHPC)に多かったことから、BA、CLAおよびAIはdmPFCと双方向性に連絡しているものの、vHPCはdmPFCに一方方向性に投射していると考えられた。さらにBAから投射を受けているパルプアルブミンニューロンをdmPFC領域に確認した。BAからのシグナルはdmPFC内において抑制的に機能すると考えられた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレス障害の発症機序ならびに神経精神基盤の成熟に与える影響について新規の分子・神経回路・行動メカニズムを見出すことを目的とし、この全人類の課題について、様々な人種・文化的背景を持つ研究者が集まる国際機関において、最先端の研究手法である光遺伝学を駆使し、革新的かつ独自のアイデアを持ち寄って共同連携研究を行うことができた。国際共同研究者とともに、「環境ストレスによって生じる精神疾患」や「認知機能に関わる神経回路の発達」のメカニズム解析を引き続き継続している。薬物依存症の周辺症状でもある不安障害や気分障害ならびに発達障害や自閉症スペクトラムなどの病態解明に波及効果があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Regarding the molecular, neural circuitry, and behavioral functions involved in the empathy-like behavior of observational fear learning, neural projections from the dorsal medial prefrontal cortex (dmPFC) were more common in the basal amygdala (BA), periaqueductal gray matter (PAG), precuneus (CLA), and agranular insular cortex (AI), and neurons output to the dmPFC were more common in the BA, CLA. The BA, CLA, AI, and ventral hippocampus (vHPC) had more neurons outputting to the dmPFC, suggesting that the BA, CLA, and AI were in bidirectional contact with the dmPFC, but the vHPC projected unidirectionally to the dmPFC. Furthermore, we identified parvalbumin neurons receiving projections from BA in the dmPFC region, suggesting that signals from BA function in an inhibitory manner within the dmPFC.

研究分野： 神経科学

キーワード： 観察恐怖学習 内側前頭前皮質

## 様式 F-19-2

### 1. 研究開始当初の背景

「高度情報化社会」が叫ばれて久しいが、さらなるインターネットの高速化とインフラの整備により、数多の情報が全世界的規模で瞬時に入手できる時代になっている。人類は膨大な情報データに暴露し、感情が正にも負にも揺れ動かされる。ヒトの脳内情報処理が追いつかず、感情バランスの制御が破綻するほどのストレス社会に世界は突入している。世界には様々な人種・文化があり、それぞれ遺伝的要因と環境的要因が異なることでストレス脆弱性も異なることが予想され、気分障害や不安障害などの精神疾患のメカニズムは不明な点が非常に多い。

近年、神経細胞の活動を時空間的に精密に制御できる実験方法として、光遺伝学および薬理遺伝学的手法が開発されている。

光遺伝学とは、光によって活性化されるタンパク分子を遺伝学的手法によって特定の細胞に発現させ、その機能を光で操作する技術である。光遺伝学の開発により、特定の神経の活動を高い時間精度で正確に操作することが可能となった。これにより神経活動と行動発現とを直接的に結びつけて制御することが可能である。

光遺伝学はきわめて高い時間・空間的な特異性を発揮できる神経活動制御技術ではあるが、侵襲性のあるレーザーを用いた光ファイバーの留置が必要なため、脳内の長期的な制御や広領域にわたる操作には不向きである。この弱点をカバーしうる技術として、最近、外因性人工化合物をリガンドとする遺伝子改変人工受容体を用いた研究がなされている。これは DREADD (designer receptor exclusively activated by designer drug) システムとよばれ、薬理遺伝学と称される。

光遺伝学ならびに薬理遺伝学的手法は最先端の技術であるにもかかわらず国外研究機関では既に汎用ツールとなりつつあり、関連論文報告数や当該技術の応用・進歩のスピードは国内でのそれをはるかに凌ぐ。さらに、扁桃体ならびに内側前頭前野(ヒトの前頭皮質に相当)の情動機能についてストレスと生後発達に基づいて研究する基課題と関連する国内における研究グループは少ない。

今回、国際共同研究の実施を計画している海外共同研究者はこれらの技術と分野研究に長けており、基課題を究めるために十分な設備と知識を兼ね備えている。以上の理由から国外グループとの共同研究が必要であった。

### 2. 研究の目的

基課題では、ストレス障害の発症機序ならびに神経精神基盤の成熟に与える影響について新規の分子・神経回路・行動メカニズムを見出すことを目的としている。この全人类的課題について、様々な人種・文化的背景を持つ研究者が集まる国際機関において、最先端の研究手法である光遺伝学ならびに遺伝薬理学的手法を駆使し、革新的かつ独自のアイデアを持ち寄って連携研究を行う。国際共同研究者とともに、「環境ストレスによって生じる精神疾患」や「認知機能に関わる神経回路の発達」のメカニズム解析を行うことで、薬物依存症の周辺症状でもある不安障害や気分障害、さらに発達障害や自閉症スペクトラムなどの病態解明に波及効果があると考えられた。

米国国立衛生研究所(National Institute of Health; NIH)の Andrew Holmes 博士の研究室では、アルコール依存症の周辺症状である神経精神学的状況(例えば気分障害や不安障害)について、慢性アルコール暴露と慢性ストレス暴露の動物モデルを使って、脳神経回路の再編成がどのように生じて感情障害や不安障害の症状が発現するのかを研究している。今回は感情と認知機能に重要である扁桃体と内側前頭前皮質が相互的な神経回路の構造と機能にストレスがどのような影響を及ぼすのかについて共同研究する。

### 3. 研究の方法

- (1) 内側前頭前皮質、腹側海馬、扁桃体および中脳水道周囲灰白質において、共感様行動に関与する神経回路をアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入と免疫組織化学的解析により同定する。
- (2) チャネルロドプシンまたはハロロドプシンを内側前頭前皮質錐体細胞に発現させ、これを興奮または抑制することで自由行動下の動物の情動行動の変容を解析する。

### 4. 研究成果

#### 2017 年度

不安障害や気分障害は脳内のセロトニンなどのモノアミン系神経伝達物質の低下が原因とする仮説が提唱されているが、第一選択薬である選択的セロトニン再取り込み阻害剤などの抗うつ薬に反応しない患者が一定数存在する。このため、これらの精神疾患の生後発達過程に応じたメカニズム解明が必要である。本研究の基課題では、思春期のストレスが神経精神基盤の成熟に与える影響について、分子・神経回路・行動メカニズムを見出すことを目的としており、情動機能調節に重要な脳部位である扁桃体および前帯状皮質における神経回路メカニズムを電気生理学的、神経化学的ならびに行動学的に検討している。

ヒトの思春期初期に相当する生後 3-4 週齢時(幼若期)に足蹠電撃による恐怖ストレスを受けたマウス(幼若期ストレスマウス)は成熟期において、高架式十字 迷路やオープンフィールドな

どの不安環境下における運動量が減少していた。また、他個体の恐怖反応に対する自身の情動反応の評価では負の共感性が亢進していた。さらに、恐怖を受けた他個体に対する社会的行動(におい嗅ぎ行動)が減少していた。この幼若期ストレスマウスの神経細胞(錐体細胞)の活動電位の発生頻度が扁桃体と前帯状皮質で亢進しており、扁桃体でのセロトニン受容体の感受性の低下を示すデータを得ている。

以上の国内研究の予備的データを基に、海外共同研究者となる Andrew Holmes 博士と 2017 年 11 月にワシントン DC にて開催された北米神経科学学会ならびに博士の主宰研究室において面会し、本研究について議論するとともに、共同研究に向けて互いの研究内容についての情報を交換した。その後も研究の方法について綿密にやり取りし、2018 年 4 月より申請者が NIH にて共同研究をスタートさせるべく 3 月末日までに渡航の準備を整えた。

#### 2018 年度

2018 年 4 月 8 日より渡米し、NIH の訪問研究者として実地での研究を開始した。共感様行動の 1 つと解釈できる観察恐怖学習に関わる分子・神経回路・行動機能について神経細胞の活動を時空間的に緻密に制御するため以下の技術習得と解析を行った。

- (1) マウスの脳定位固定による標的脳部位への逆行性標識物質およびアデノ随伴ウィルスの局所注入技術の習得
- (2) 腹側海馬(vHPC)より入力を受ける内側前頭前皮質背側部(dmPFC)ニューロンの特徴と同ニューロンの出力部位の解析
- (3) dmPFC 内パルブアルブミン陽性(Pvalb)ニューロンの活動を光刺激によって抑制することによる観察恐怖学習の変化
- (4) オキシトシン作働性ニューロンおよびその投射部位とオキシトシン受容体発現ニューロンの分布解析
- (5) オキシトシン作働性神経終末の光刺激抑制による観察学習行動の変化

これらの成果について以下列挙する。

- (2)について:vHPCより入力を受けるdmPFCニューロンはカルシウムカルモジュリンキナーゼII陽性ニューロン、Pvalbニューロン、ソマトスタチン陽性ニューロンの順で分布が多く、dmPFCニューロンの出力は扁桃体基底部(BA)、中脳水道周囲部灰白質(PAG)、前障(CLA)、無顆粒島皮質(AI)に多かった。一方、dmPFCに出力するニューロンはBA、CLA、AIおよびvHPCに多かったことから、BA、CLAおよびAIはdmPFCと双方向性に連絡しているが、vHPCはdmPFCに一方向性に投射していると考えられる。
- (4)について:オキシトシン作働性ニューロンの出力はdmPFC、扁桃体ならびにvHPCで乏しく、腹側被蓋野およびPAGで顕著だった。

#### 2019 年度

2019 年 4 月 7 日に日本に帰国し、共感様行動の 1 つと解釈できる観察恐怖学習に関わる分子・神経回路・行動機能について引き続き以下の解析を行った。

- (1) 腹側海馬(vHPC)より入力を受ける内側前頭前皮質背側部(dmPFC)ニューロンの特徴と同ニューロンの出力部位の解析
- (2) dmPFC 内 Pvalb ニューロンの活動を光刺激によって抑制することによる観察恐怖学習の変化
- (3) オキシトシン作働性ニューロンおよびその投射部位とオキシトシン受容体発現ニューロンの分布解析
- (4) オキシトシン作働性神経終末の光刺激抑制による観察学習行動の変化
- (5) 観察恐怖によって活性化するニューロンの脳内分布の網羅的解析
- (6) 中脳水道周囲部灰白質(PAG)に投射する dmPFC ニューロンの側枝分布の解析

成果について以下列挙する。

- (4)について:オキシトシン作働性神経終末にハロロドプシンを発現させたマウスの dmPFC に光プローブを埋め込み、観察恐怖中のすくみ行動の変化を検討した。

#### 2020 年度

共感様行動の 1 つと解釈できる観察恐怖学習に関わる分子・神経回路・行動機能について引き続き以下の解析を行った。

- (1) 腹側海馬(vHPC)より入力を受ける内側前頭前皮質背側部(dmPFC)ニューロンの特徴と同ニューロンの出力部位の解析
- (2) dmPFC 内 Pvalb ニューロンの活動を光刺激によって抑制することによる観察恐怖学習の変化
- (3) オキシトシン作働性ニューロンおよびその投射部位とオキシトシン受容体発現ニューロンの分布解析
- (4) オキシトシン作働性神経終末の光刺激抑制による観察学習行動の変化

- (5) 観察恐怖によって活性化するニューロンの脳内分布の網羅的解析
- (6) 中脳水道周囲部灰白質(PAG)に投射する dmPFC ニューロンの側枝分布の解析

成果について以下列挙する。

- (3)について:オキシトシン作働性ニューロンの出力は dmPFC、扁桃体ならびに vHPC で乏しく、腹側被蓋野および PAG で顕著であった所見について論文を作成・投稿し、受理された。
- (4)について:オキシトシン作働性神経終末にハロロドプシンを発現させたマウスの dmPFC に光プローブを埋め込み、観察恐怖中のすくみ行動の変化を引き続き検討した。

#### 2021 年度

共感様行動である観察恐怖学習に関わる分子・神経回路・行動機能について、昨年度までの研究から内側前頭前皮質背側部(dmPFC)からの神経投射は扁桃体基底部(BA)、中脳水道周囲灰白質(PAG)、前障(CLA)、無顆粒島皮質(AI)に多く、dmPFC に出力するニューロンは BA、CLA、AI および腹側海馬(vHPC)に多かったことから、BA、CLA および AI は dmPFC と双方向性に連絡しているものの、vHPC は dmPFC に一方向性に投射していると考えられた。

これを踏まえ、今年度は BA から dmPFC に投射する神経線維は dmPFC のどのようなニューロンとシナプス形成するのかを検討した。Pvalb Cre マウスを用い、BA にアデノ随伴ウイルスベクターである AAV1-Flp を、dmPFC に AAV-CreON/FlpON-YFP を注入した。AAV1-Flp は投射先のニューロンにシナプスを介して Flippase を発現させる特徴を持つ。

その結果、BA から投射を受けていることを裏付ける Pvalb ニューロンを dmPFC に確認した。BA からのシグナルは dmPFC 内において抑制性に機能すると考えられた。このデータは、現在論文作成中である dmPFC 内 Pvalb ニューロンの活動を光刺激によって抑制することによる観察恐怖学習の変化についての有力な証拠となり得る。

また、このシグナルの修飾機構としてセロトニン作働性神経の役割について今後検討している。

#### 2022 年度

不安障害や気分障害は脳内のセロトニンなどのモノアミン系神経伝達物質の低下が原因とする仮説が提唱されているが、第一選択薬である選択的セロトニン再取り込み阻害剤などの抗うつ薬に反応しない患者が一定数存在する。このため、これらの精神疾患の生後発達過程に応じたメカニズム解明が必要である。本研究では、思春期のストレスが神経精神基盤の成熟に与える影響について、分子・神経回路・行動メカニズムを見出すことを目的とし、情動機能調節に重要な脳部位である内側前頭前皮質における神経回路メカニズムを電気生理学的、神経化学的ならびに行動学的に検討した。

ヒトの思春期初期に相当する生後 3-4 週齢時(幼若期)に足蹠電撃による恐怖ストレスを受けたマウス(幼若期ストレスマウス)は成熟期において、不安環境下における運動量が減少していた。

また、共感性の評価系として、他個体の恐怖反応に対する自身の情動反応の評価である観察恐怖学習試験を実施した結果、負の共感性と解釈できるすくみ行動が亢進していた。

さらに、恐怖を受けた他個体に対する社会的行動であるにおい嗅ぎ行動が減少していた。この幼若期ストレスマウスの神経細胞(錐体細胞)の活動電位の発生頻度が扁桃体と前帯状皮質で亢進しており、扁桃体でのセロトニン受容体の感受性の低下を示すデータを得た。

共感様行動である観察恐怖学習に関わる分子・神経回路・行動機能について、内側前頭前皮質背側部(dmPFC)からの神経投射は扁桃体基底外側核(BLA)、中脳水道周囲灰白質外側部/背外側部(1/v1PAG)、前障(CLA)、無顆粒島皮質(AI)に多かったことから、今年度は BLA ならびに 1/v1PAG に投射する dmPFC 神経細胞のうち、観察恐怖学習によって活性化する神経細胞の割合を検討した。

mPFC の錐体細胞が BLA または PAG を制御調節する可能性を検討するために、BLA または PAG に逆行性トレーサーである蛍光標識コレラ毒素を注入し、観察恐怖学習後の神経活動で誘導される最初期遺伝子である c-fos の発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、mPFC 領域において、BLA に投射する細胞は 2, 3 層に、PAG に投射する神経細胞は 5 層にそれぞれ多く分布していた。BLA 投射細胞および PAG 投射細胞の内、c-fos を発現する細胞はいずれも 2 割程度であった。この結果は 2 つの可能性を示唆する。(I)観察恐怖学習によって活性化する BLA や PAG に投射する mPFC 錐体細胞の関与は小さい。(II)活性化するのは抑制性ニューロンであり、錐体細胞は抑制されることで観察恐怖学習に寄与する。これらの可能性については今後更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Glover Lucas R, McFadden Kerry M, Bjorni Max, Smith Sawyer R, Rovero Natalie G, Oreizi-Esfahani Sarvar, Yoshida Takayuki, Postle Abigail F, Nonaka Mio, Halladay Lindsay R, Holmes Andrew	4. 巻 9
2. 論文標題 A prefrontal-bed nucleus of the stria terminalis circuit limits fear to uncertain threat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e60812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.60812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Aikawa Katsuhiko, Yoshida Takayuki, Ohmura Yu, Lyttle Kerise, Yoshioka Mitsuhiro, Morimoto Yuji	4. 巻 1746
2. 論文標題 Subanesthetic ketamine exerts antidepressant-like effects in adult rats exposed to juvenile stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146980 ~ 146980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2020.146980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takayuki Yoshida, Midori Kobie, Yu Ohmura, Mitsuhiro Yoshioka
2. 発表標題 Juvenile stress-induced alteration of emotional contagion and intrinsic neuronal membrane plasticity in the mouse brain
3. 学会等名 Neuroscience2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Yoshida, Katsuhiko Aikawa, Yu Ohmura, Yuji Morimoto, Mitsuhiro Yoshioka
2. 発表標題 Subanesthetic ketamine rapidly reverses depressive-like alterations induced by juvenile stress in adult rats
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayuki Yoshida, Hiromu Okaki, Midori Kobie, Katsunori Nonogaki, Mitsuhiro Yoshioka
2. 発表標題 Early life stress-induced alteration of empathy-like behavior and intrinsic neuronal membrane plasticity in the mouse brain
3. 学会等名 第90回日本薬理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Yoshida, Midori Kobie, Yuko Ida, Hiromu Okaki, Yukihiro Fujita, Mitsuhiro Yoshioka
2. 発表標題 Early life stress-induced alteration of emotional contagion and intrinsic neuronal membrane plasticity in the mouse brain
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ホルムズ アンドリュー  (Holmes Andrew)	アメリカ国立衛生研究所・National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism・Senior Investigator	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	国立衛生研究所(NIH)	アルコール乱用・依存研究所(NIAAA)	